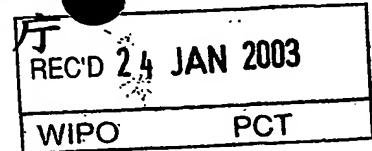


PCT/JP02/13687
Rec'd PCT/PTO 28 JUN 2004
26.12.02

日 本 国 特 許
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年12月28日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-400979

[ST.10/C]:

[JP2001-400979]

出 願 人

Applicant(s):

テルモ株式会社

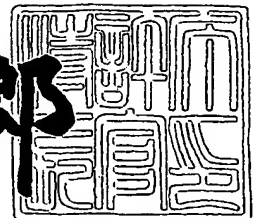
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2002年11月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2002-3088653

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 TE0100153

【提出日】 平成13年12月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61J 1/10
A61M 1/02

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内

【氏名】 佐藤 謙一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内

【氏名】 亀山 俊樹

【特許出願人】

【識別番号】 000109543

【氏名又は名称】 テルモ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080159

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 望稔

【電話番号】 3864-4498

【選任した代理人】

【識別番号】 100090217

【弁理士】

【氏名又は名称】 三和 晴子

【電話番号】 3864-4498

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006910

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9804199

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血液バッグシステムおよび病原微生物の不活化方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗凝固剤が収容された血液バッグと、血液に含まれる病原微生物を不活性化する不活化剤が収容された容器とが連結された血液バッグシステムであって、該不活化剤が、該微生物の核酸に結合できる白金化合物または該白金化合物のアコ錯体を主成分とするものであることを特徴とする血液バッグシステム。

【請求項 2】

抗凝固剤および血液に含まれる病原微生物を不活性化する不活化剤が収容された血液バッグシステムであって、該不活化剤が、該微生物の核酸に結合できる白金化合物または該白金化合物のアコ錯体を主成分とするものであることを特徴とする血液バッグシステム。

【請求項 3】

前記白金化合物が、シスプラチン、カルボプラチンおよびネダプラチンのうちのいずれか一つである請求項 1 または 2 に記載の血液バッグシステム。

【請求項 4】

前記白金化合物のアコ錯体が、モノアコ錯体、ジアコ錯体、モノアコモノヒドロキソ錯体およびジヒドロキソ錯体のうちの少なくとも一つである請求項 1 または 2 に記載の血液バッグシステム。

【請求項 5】

前記病原微生物が DNA 型ウイルス、RNA 型エンベロープウイルスおよび細菌のうちの少なくとも一つである請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の血液バッグシステム。

【請求項 6】

血液に含まれる病原微生物を不活化する方法であって、予め採取した血液が収容された血液バッグに、該病原微生物の核酸に結合できる白金化合物または該白金化合物のアコ錯体を主成分とする微生物不活化剤を添加することを特徴とする病原微生物の不活化方法。

【請求項 7】

前記微生物不活化剤を 0. 0 7 m M 以上となるように添加し、前記血液バッグに収容された血液中の 1 log 以上の前記病原微生物を不活化させる請求項 6 に記載の病原微生物の不活化方法。

【請求項 8】

前記微生物不活化剤を添加した後に、アミノ酸化合物またはチオ硫酸塩を主成分とする中和剤を添加して該不活化剤を中和処理する請求項 6 または 7 に記載の病原微生物の不活化方法。

【請求項 9】

前記中和剤が、メチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムである請求項 8 に記載の病原微生物の不活化方法。

【請求項 1 0】

前記中和剤を前記微生物不活化剤の 1 0 ～ 5 0 0 倍の濃度となるように添加する請求項 8 または 9 に記載の病原微生物の不活化方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血液中の病原微生物を不活化する方法、不活化剤を中和処理する方法および、微生物学的、毒性学的に安全な血液製剤を供給する血液バッグシステムに関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

現代の医療に欠かせない輸血であるが、1 9 8 5 年に米国赤十字社が H I V (ヒト免疫不全ウイルス) 汚染血液除去のためのスクリーニングを開始するまでに、9 0 0 0 人が輸血により H I V に感染した。それ以降、血液製剤はウイルス感染のスクリーニングが行われ、感染血液製剤が排除されたことで輸血による感染者数は僅か 4 1 人となった。しかし、それでもなお、現在のスクリーニング技術では、検査項目以外のウイルスを検出することは不可能で、新種のウイルスに感染する危険性を排除することはできない。

【0003】

これまでに開発されたウイルス不活化技術として、血漿製剤におけるSolvent/Detergent(SD) 処理が知られるが、ノンエンベロープウイルスに効果がないなど、必ずしも安全な血液製剤が供給されていると言えない状況にある。このため、近年、安全な血液を供給するためのウイルス不活化剤の開発が活発である。

【0004】

例えば、エチレンイミンオリゴマーを含むウイルス不活化剤が提案されている(W09707674, W09917802) が、エチレンイミンオリゴマーはウイルスの不活化に優れるが、不安定な構造のため室温で分解を起こす。このため、エチレンイミンオリゴマーを用いて血液製剤の微生物に対する不活化を行う場合には、作業者が感染する危険性が非常に高い。

【0005】

また、エチレンイミンオリゴマーの製造・保存には、低温維持が必要になり、エチレンイミンオリゴマーを含む微生物不活化剤の製造設備や輸送、保管にも多大な費用がかかるばかりでなく、医療現場で使用されるエチレンイミンオリゴマーを含む微生物不活化剤の安全管理により一層の注意が求められるのである。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明の目的は、従来の微生物不活化剤がもたらす諸問題を解消した、血液中の病原微生物の不活化方法、該不活化剤を中和処理する方法および、微生物学的、毒性学的に安全な血液製剤を供給する血液製剤用血液バッグシステムを提供することにある。特に、微生物の不活化効果が大きく、持続性があり、かつ光、温度などの環境条件に対して安定な血液製剤用血液バッグシステムを提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

第一の本発明は、抗凝固剤が収容された血液バッグと、血液に含まれる微生物を不活化する不活化剤が収容された容器とが連結された血液バッグシステムであって、該不活化剤が、該微生物の核酸に結合できる白金化合物または該白金化合

物のアコ錯体を主成分とするものであることを特徴とする血液バッグシステムであり、また、抗凝固剤および血液に含まれる病原微生物を不活化する不活化剤が収容された血液バッグシステムであって、該不活化剤が、該微生物の核酸に結合できる白金化合物または該白金化合物のアコ錯体を主成分とするものであることを特徴とする血液バッグシステムである。

【0008】

第一の本発明において、前記白金化合物が、シスプラチン、カルボプラチンおよびネダプラチンのうちのいずれか一つであるのが好ましい。

【0009】

第一の本発明において、前記白金化合物のアコ錯体が、モノアコ錯体、ジアコ錯体、モノアコモノヒドロキソ錯体およびジヒドロキソ錯体のうちの少なくとも一つであるのが好ましい。

【0010】

第一の本発明において、前記病原微生物が、DNA型ウイルス、RNA型エンペローブウイルスおよび細菌のうちの少なくとも一つであるのが好ましい。

【0011】

第二の本発明は、血液に含まれる微生物を不活化する方法であって、予め採取した血液が収容された血液バッグに、該病原微生物の核酸に結合できる白金化合物または該白金化合物のアコ錯体を主成分とする微生物不活化剤を添加することを特徴とする病原微生物の不活化方法である。

【0012】

第二の本発明において、前記微生物不活化剤を0.07mM以上となるように添加し、前記血液バッグに収容された血液中の1log以上の前記病原微生物を不活化させるのが好ましい。

【0013】

第二の本発明において、前記微生物不活化剤を添加した後に、アミノ酸化合物またはチオ硫酸塩を主成分とする中和剤を添加して該不活化剤を中和処理するのが好ましい。

【0014】

第二の本発明において、前記中和剤が、メチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムであるのが好ましい。

【0015】

第二の本発明において、前記中和剤を前記微生物不活化剤の10～500倍の濃度となるように添加するのが好ましい。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明は、抗凝固剤が収容された血液バッグと、血液に含まれる病原微生物を不活化する不活化剤が収容された容器とが連結された血液バッグシステム、または抗凝固剤および血液に含まれる病原微生物を不活化する不活化剤が収容された血液バッグシステムにおいて、該不活化剤として白金系抗がん剤を使用して、血液に含まれる病原微生物を不活化する方法、白金系抗がん剤を中和剤を用いて中和処理する方法、および不活化効果が大きく、持続性があり、かつ熱、光などの環境条件の変化に対して安定な血液バッグシステムである。

【0017】

本発明に使用される、抗凝固剤が収容された血液バッグと、その他のバッグとが連結された血液バッグシステムは従来公知である。

血液バッグシステムの基本構造は、例えば、図1に示すように、血液バッグ1と、血液中に含まれる病原微生物を不活化する不活化剤が収容された容器2と、複数の血液成分バッグ3、4とが連結チューブ5により連結したシステムである。血液バッグ1には、採血チューブ6が連結され、その先端には採血針7が装着されている。連結チューブ5はアルミリングで圧着したり、ヒートシーラーで熱融着されて、封止できるようになっている。また、成分バッグ3、4はバッグ毎に容易に切り離しできるようになっている。

該システムを構成する各部品は、安全性に配慮して、可塑剤入り塩化ビニル樹脂などの熱可塑性樹脂の成形品であるのが好ましい。

【0018】

血液バッグ1には、抗凝固剤が収容されており、採取された血液の凝固を防止することができる。また、容器2には、不活化剤が収容されている。該不活化剤

は、連結チューブ5を通して血液バッグ1に導入される。その結果、採取された血液に含まれる病原微生物が不活化される。

別法として、該不活化剤を予め採血バッグ1に収容しておいてもよい。ただし、アデニンを含む血液保存剤を用いる場合は、アデニンが白金化合物と反応するので、病原微生物を不活化する前に、白金化合物とアデニンを混合することを回避しなければならない。

【0019】

血液に含まれている病原微生物は、DNA型ウイルス、RNAエンベロープウイルス、細菌などである。ウイルスは遺伝学的にはDNA型とRNA型に分類され、構造的にはウイルス膜（エンベロープ）の有無で分類されている。現在、輸血感染で問題となるHIV、HCV（ヒトC型肝炎ウイルス）はRNA型のエンベロープウイルスであり、HBV（ヒトB型肝炎ウイルス）はDNA型のエンベロープウイルスである。

また、輸血感染で問題となる細菌は、*Yersinia enterocolitica*（エルシニア菌）、*Serratia marcescens*（セラチア菌）などである。これらに感染している患者の血中菌数は $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^2$ CFU/mLであるが、不活化剤が含有されていない血液バッグを使用して採血すると、約3週間で $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ CFU/mLに増加し、このような濃度の血液を輸血するとエンドトキシンショックで死亡することがある。

【0020】

本発明は、輸血用血液の病原微生物を不活化する薬剤として、抗がん剤として知られる白金化合物、とりわけ、病原微生物の核酸と結合できる白金化合物および／または該白金化合物のアコ錯体（両者を単に白金化合物と称することもある）を用いる発明である。病原微生物の核酸に該白金化合物が結合することにより、微生物が不活化されるものと推定される。

【0021】

本発明に使用される白金化合物は微生物の核酸に結合性を有するものであり、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチンなどである。これらは2種以上併用することもできる。

また、本発明には、該白金化合物のアコ錯体、すなわち、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチンなどのアコ錯体を使用することができる。アコ錯体としては、モノアコ錯体、ジアコ錯体、モノアコモノヒドロキソ錯体、ジヒドロキソ錯体が好適である。これらは2種以上併用することができる。また、前記白金化合物と併用することもできる。

【0022】

白金化合物は、光により分解したり、イオン濃度により安定性が変わるので、本発明に使用する場合には、遮光容器を用いたり、塩化ナトリウムなどによりイオン濃度を調整して使用するのが好ましい。

【0023】

本発明における白金化合物の使用量は、時間、温度、病原微生物を含む血液成分組成と濃度などにより変化する。最終濃度が0.0209mMであっても、血液バッグ内に収容された血液中の病原微生物を不活化させることができるが、最終濃度が0.07～100mM、好ましくは1～10mMの白金化合物であれば、血液中の病原微生物を1log以上不活化させることができる。白金化合物の最終濃度が上限値以上であると、溶媒によっては容易に溶解することができないので、溶液を調整するのが難しい。

【0024】

本発明における白金化合物の使用量は、シスプラチンの場合、赤血球製剤に対し8.4mg/mL～12mg/mL、好ましくは0.12g/mL～1.2g/mLである。

【0025】

なお、シスプラチンのがん細胞に対する有効濃度は0.25 μ g/mL (Ehrlichがん初代培養細胞に対する増殖阻害活性(IC₅₀))であるから、前記不活化濃度8.4 μ g/mLは33600倍もの高濃度である。すなわち、血液製剤の場合には、ヒトへの抗がん剤としての使用濃度より遥かに高濃度で使用するようになる。

【0026】

本発明において、白金化合物を血液に添加し、白金化合物と微生物の核酸とを反応させる温度は、0℃以上であればよいが、血液製剤への影響を考慮して、4～30℃であるのが好ましい。

また、本発明において、白金化合物を血液に添加すると、白金化合物と微生物の核酸とは直ちに反応を開始するが、微生物の不活化をより完璧にするために3時間以上反応させるのが好ましい。

【0027】

本発明において使用される白金化合物は毒性学的には毒物に属するので、毒性を和らげるために、すなわち、抗がん剤の毒性を毒性学的に安全にするために通常使用される中和剤を、不活化後の白金化合物を含有する血液製剤に添加するのが好ましい。また、光照射して、中和処理することもできる。なお、中和処理は白金化合物の微生物の核酸に対する反応性を低下させることに通じる。

【0028】

中和剤は微生物不活化剤である白金化合物濃度の42倍以上の濃度で、白金化合物と反応させれば完全に中和処理できるが、通常は10～500倍、好ましくは25～100倍の濃度になるように添加される。

中和処理は、0℃以上の温度であれば効果が現れるが、血液製剤の機能への影響を考慮して4～30℃で反応させるのが好ましい。

また、白金化合物を添加すると直ちに反応を開始するが、中和処理を確実にするために30分～1時間程度反応させるのがよい。

【0029】

中和剤は、例えば、シスプラチンに対してはチオ硫酸ナトリウムなどのチオ硫酸塩、メチオニン、システインなどのアミノ酸、グルタチオン、補酵素Aなどのチオール化合物であるが、チオ硫酸ナトリウムやメチオニンが好適である。なお、メチオニンのような光分解性中和剤は、遮光容器で保存するのが好ましい。

【0030】

本発明の血液バッグシステムによって、病原微生物が不活化され、さらに中和処理された血液または血液成分は、バッグ毎に切り離され、輸血に使用される。保存、輸送に際しては、従来のバッグに適用された方法、手段がそのまま適用できる。

【0031】

【実施例】

(実施例1)

[DNA型のノンエンベロープウイルスであるシミアンウイルス40 (SV-40) のウイルス不活化]

図1に示す血液バッグシステムの400mLのCPDA血液バッグに、ヒト健康人より採血を行い、RC-MAP (濃厚赤血球製剤) を調整した。その後、RC-MAP 2mLを無菌的に15mLの遠心管に採取し、 10^8 TCID₅₀/mL (50%感染終末点) のSV-40を2mL添加し、軽く攪拌した。これに、2mLの1.67mMシスプラチン (プリプラチン「登録商標」)、3.5mMカルボプラチン (パラプラチン「登録商標」)、3.5mMネダプラチン (アクプラ「登録商標」) をそれぞれ加え、軽く攪拌した後、室温 (暗所) で7時間反応させ、不活化を行った。不活化生成液を3000rpmで1分間遠心分離し、遠心上清をウイルス不活化評価に用いた。なお、カルボプラチン、ネダプラチンはりん酸緩衝液に溶解して調製した。

【0032】

ウイルス不活化評価は、96ウエルのマイクロプレートを用いたTCID₅₀で行った。25cm²の細胞培養用フラスコ中で、SV-40の増殖細胞であるCV-1細胞 (サル腎臓由来細胞) を1.0%胎児牛血清加MEM培地で3日間培養し、増殖させた後、0.5mLの0.05%トリプシン-EDTAで浮遊させ、25mLの1.0%胎児牛血清加MEM培血で細胞浮遊液を調製した。

【0033】

該細胞浮遊液を96ウエルのマイクロプレートの各ウエルに90μLずつ添加した後、96ウエルのマイクロプレート上の第一列目に反応液 (前記遠心上清) を10μL添加し、ピペッティングを行い、攪拌した。さらに、第一列目の各ウエルの溶液を第二列目の各ウエルに10μL添加して10倍の段階希釈操作を第十二列目のウエルまで行った。これを37℃の5%炭酸ガスインキュベーター内で10日間の培養を行い、SV-40による細胞変性 (CPE) の有無を光学顕微鏡で確認し、TCID₅₀を算出した。

同時に白金化合物の代わりにりん酸緩衝液を添加した陽性コントロールのTCID₅₀から白金化合物と反応させて得た生成液のTCID₅₀を差し引いた値をS

V-40の死滅効果とした。

【0034】

結果を図2に示す。陽性コントロールのTCID₅₀ (6.5) からシスプラチン、カルボプラチン、ネタプラチンと反応させた生成液のTCID₅₀ (それぞれ1.25、5.50、2.25) を差し引いた結果、1.67mMシスプラチンは5.25 log₁₀、3.5mMカルボプラチンは1.00 log₁₀、3.5mMネタプラチンは4.25 log₁₀の死滅効果が確認された。

【0035】

(実施例2)

[DNA型エンベロープウイルスであるヒトサイトメガロウイルス (HCMV) のウイルス不活化]

図1に示す血液バッグシステムの400mLのCPDA血液バッグに、ヒト健康人より採血を行い、RC-MAPを調製した。その後、RC-MAP 2mLを無菌的に15mLの遠心管に採取し、10⁷ TCID₅₀/mLのHCMVを2mL添加し、軽く攪拌した。これに、2mLの1.67mMシスプラチン (プリプラチン「登録商標」) を加え、軽く攪拌した後、室温 (暗所) で7時間反応させ、不活化を行なった。不活化生成液を3000rpmで1分間遠心分離し、遠心上清をウイルス不活化評価に用いた。

【0036】

ウイルス不活化評価は、96ウエルのマイクロプレートを用いたTCID₅₀で行った。25cm²の細胞培養用フラスコ中で、HCMVの増殖細胞であるHEL細胞 (初代ヒト胎児肺繊維芽細胞) を10%胎児牛血清加MEM培地で3日間培養し、増殖させた後、0.5mLの0.05%トリプシン-EDTAで浮遊させ、25mLの10%胎児牛血清加MEM培血で細胞浮遊液を調製した。

【0037】

この細胞浮遊液を96ウエルのマイクロプレートの各ウェルに90μLずつ添加した後、96ウエルのマイクロプレート上の第一列目に生成液 (前記遠心上清) を10μL添加し、ピペッティングを行い、攪拌した。さらに、第一列目の各ウェルの溶液を第二列目の各ウェルに10μL添加して10倍の段階希釈操作を

第十二列目のウェルまで行った。これを37℃の5%炭酸ガスインキュベーター内で14日間の培養を行った後、HCMVによる細胞変性(CPE)の有無を光学顕微鏡で確認し、TCID₅₀を算出した。同時に白金化合物の代わりにりん酸緩衝液を添加した陽性コントロールのTCID₅₀から白金化合物と反応させた生成液のTCID₅₀を差し引いた値をシスプラチンの抗HCMV効果とした。

【0038】

その結果、陽性コントロールのTCID₅₀(5.25)からシスプラチンと反応させた生成液のTCID₅₀(1.25)を差し引き、1.67mMシスプラチンはRC-MAP中でHCMVを4.00log₁₀死滅させたことがわかった。

【0039】

(実施例3)

[RNA型エンベロープウイルスであるマウス肝炎ウイルス(MHV)のウイルス不活性化]

図1に示す血液バッグシステムの400mLのCPDA血液バッグに、ヒト健常人より採血を行い、RC-MAPを調製した。その後、RC-MAP 2mLを無菌的に15mLの遠心管に採取し、10⁷ TCID₅₀/mLのMHVを2mL添加し、軽く攪拌した。これに、2mLの1.67mMシスプラチン(プリプラチン「登録商標」)を加え、軽く攪拌した後、室温(暗所)で7時間反応させ、不活化を行なった。不活化生成液を3000rpmで1分間遠心分離し、遠心上清をウイルス不活化評価に用いた。

【0040】

ウイルス不活化評価は、96ウェルのマイクロプレートを用いたTCID₅₀で行った。25cm²の細胞培養用フラスコ中で、MHVの増殖細胞であるDBT細胞を5%胎児牛血清加MEM培地で3日間培養し、増殖させた後、0.5mLの0.05%トリプシン-EDTAで浮遊させ、25mLの10%胎児牛血清加MEM培地で細胞浮遊液を調製した。

【0041】

この細胞浮遊液を96ウェルのマイクロプレートの各ウェルに90μLずつ添加した後、96ウェルのマイクロプレート上の第一列目に生成液を10μL添加

し、ピペッティングを行い、攪拌した。さらに、第一列目の各ウエルの溶液を第二列目の各ウエルに10 μ L 添加して10倍の段階希釈操作を第十二列目のウエルまで行った。これを37℃の5%炭酸ガスインキュベーター内で14日間の培養を行った後、MHVによる細胞変性(CPE)の有無を光学顕微鏡で確認し、TCID₅₀を算出した。同時に白金化合物の代わりにりん酸緩衝液を添加した陽性コントロールのTCID₅₀から白金化合物と反応させた生成液のTCID₅₀を差し引いた値をシスプラチンのMHV不活化効果とした。

【0042】

その結果、陽性コントロールのTCID₅₀(5.50)からシスプラチンと反応させた生成液のTCID₅₀(1.25)を差し引き、1.67mMシスプラチンはRC-MAP中でMHVを4.0log₁₀死滅させたことがわかった。

【0043】

(実施例4)

[細菌Yersinia enterocolitica (エルシニア菌)の細菌不活化]

図1に示す血液バッグシステムの400mLのCPDA血液バッグに、ヒト健康人より採血を行い、RC-MAPを調製した。その後、RC-MAP 2mLを無菌的に15mLの遠心管に採取し、10⁸ CFU/mLのエルシニア菌を2mL添加し、軽く攪拌した。これに、4.00mM、2.00mM、1.00mM、0.50mM、0.25mM、0.125mM、0.0625mMのシスプラチン(和光純薬株式会社製シスプラチンを生理食塩水に溶解させて調製した)2mLをそれぞれ加え、軽く攪拌した後、室温(暗所)で7時間反応させ、不活化を行なった。不活化生成液を3000rpmで1分間遠心分離し、遠心上清を細菌不活化評価に用いた。

【0044】

抗細菌活性の評価は、生成液1mLを9mLの滅菌生理食塩液に添加した後、タッチミキサーで攪拌し、得られた液を、さらに、9mLの生理食塩液に添加して希釈した10倍の段階希釈操作を行ったものを対象にした。各段階の希釈液1mLまたは100 μ Lを、15mLのソイビーンカゼインダイジェスト寒天培地を含む直径9cmのシャーレ中で混釈した。これを31℃で2日間培養し、出現したコロニー数を生残菌数とした。

なお、シスプラチンを添加していないものを陽性コントロールとしておき、陽性コントロールの生残菌数からシスプラチンの菌数を差し引き細菌不活化効果とした。

【0045】

結果を図3に示す。陽性コントロールの菌数 ($5.00 \log_{10}$) から生成液の菌数、それぞれ 1.33 mM で $0.06 \log_{10}$ 、 0.67 mM で $1.48 \log_{10}$ 、 0.33 mM で $2.27 \log_{10}$ 、 0.17 mM で $2.80 \log_{10}$ 、 0.083 mM で $3.79 \log_{10}$ 、 0.042 mM で $4.52 \log_{10}$ 、 0.0209 mM で $4.82 \log_{10}$ を差し引き、 1.33 mM で $4.94 \log_{10}$ 、 0.67 mM で $3.52 \log_{10}$ 、 0.33 mM で $2.73 \log_{10}$ 、 0.17 mM で $2.20 \log_{10}$ 、 0.083 mM で $1.21 \log_{10}$ 、 0.042 mM で $0.48 \log_{10}$ 、 0.0209 mM で $0.18 \log_{10}$ を死滅させることがわかる。

【0046】

[シスプラチンの無毒化／チオ硫酸ナトリウムまたはメチオニンと反応させた後の抗エルシニア菌活性]

図1に示す血液バッグシステムの400mLのCPDA血液バッグに、ヒト健常人より採血を行い、RC-MAPを調製した。その後、RC-MAP 2mLを無菌的に15mLの遠心管に採取し、2mLの4.00mMシスプラチン（和光純薬株式会社製シスプラチンを生理食塩水に溶解させて調製した）を添加し、軽く攪拌した。これに、168mM、84mM、42mM、21mM、10.5mM、5.25mM、2.63mM、1.31mMのL-メチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムを2mL添加し、室温で30分間反応させた。また、メチオニンまたはチオ硫酸ナトリウムの代わりにりん酸緩衝液を添加したものをシスプラチンなしとした。その後 10^8 CFU/mL のエルシニア菌を10μL添加し、攪拌した後の菌数を測定した。

【0047】

菌数測定は、生成液1mLを9mLの滅菌生理食塩液に添加した後、タッチミキサーで攪拌した液を、さらに9mLの生理食塩液に添加して希釈を行う10倍の段階希釈操作を3回行ったものを対象にした。各段階の希釈液10mL、1mLまたは100μLを15mLのソイビーンカゼインダイジェスト寒天培地を含む直径9cmの

シャーレ中で混釈した。これを 31°C で2日間培養し、出現したコロニー数を生残菌数とした。

【0048】

図4にメチオニンを用いた中和処理の結果を示す。その結果、メチオニン56mMでは、エルシニア菌は全く死滅せず、28mMで $3.36 \log_{10}$ 、14mMで $1.87 \log_{10}$ 、7mMで $1.43 \log_{10}$ 、3.5mMで $1.22 \log_{10}$ 、1.75mMで $0.89 \log_{10}$ 、0.88mMで $0.73 \log_{10}$ 、0.44mMで $0.34 \log_{10}$ が生残していた。

一方、チオ硫酸ナトリウムを用いた中和処理の結果を図5に示す。チオ硫酸ナトリウム56mMではエルシニア菌は全く死滅せず、28mMで $4.22 \log_{10}$ 、14mMで $2.35 \log_{10}$ 、7mMで $1.98 \log_{10}$ 、3.5mMで $1.51 \log_{10}$ 、1.75mMで $1.28 \log_{10}$ 、0.88mMで $0.86 \log_{10}$ 、0.44mMで $0.44 \log_{10}$ の菌が生残していた。

【0049】

[シスプラチンの中和処理/シスプラチンをチオ硫酸ナトリウムまたはメチオニンと反応させた後の抗SV-40活性]

図1に示す血液バッグシステムの400mLのCPDA血液バッグに、ヒト健常人より採血を行い、RC-MAPを調製した。その後、RC-MAP 1mLを無菌的に15mLの遠心管に採取し、1mLの3.5mMシスプラチンを添加し、軽く攪拌した。これに、175mMのチオ硫酸ナトリウムを1mL添加し、室温で30分間反応させた。その後、 $10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ のSV-40を0.5mL添加し、軽く攪拌した後、室温のインキュベーター内（暗所）で30分間反応させた。生成液を3000rpmで1分間遠心分離し、遠心上清をウイルス不活化効果の評価に用いた。

【0050】

ウイルス不活化評価は、96ウエルのマイクロプレートを用いた TCID_{50} で行った。 25 cm^3 の細胞培養用フラスコ中で、SV-40の増殖細胞であるCV-1細胞（サル腎臓由来細胞）を10%胎児牛血清加MEM培血で3日間培養し、増殖させた後、0.5mLの0.05%トリプシン-EDTAで浮遊させ、25

mLの10%胎児牛血清加MEM培血で細胞浮遊液を調製した。

【0051】

この細胞浮遊液を96ウエルのマイクロプレートの各ウエルに90 μ Lずつ添加した後、96ウエルのマイクロプレート上の第一列目に生成液を10 μ L添加し、ピペティングを行い、攪拌した。さらに、第一列目の各ウエルの溶液を第二列目の各ウエルに10 μ L添加して10倍の段階希釈操作を第十二列目のウエルまで行った。これを37℃の5%炭酸ガスインキュベーター内で10日間の培養を行った後、SV-40による細胞変性(CPE)の有無を光学顕微鏡で確認し、TCID₅₀を算出した。同時に白金化合物の代わりにりん酸緩衝液を添加した陽性コントロールのTCID₅₀から白金化合物と反応させた反応液のTCID₅₀を差し引いた値をシスプラチンの抗SV-40効果とした。

【0052】

その結果、陽性コントロールのTCID₅₀(6.00log₁₀)から3.5mMシスプラチンに175mMのチオ硫酸ナトリウムを添加したTCID₅₀(6.00log₁₀)を差し引くと、ウイルス不活化効果は認められなかった。これは、3.5mMシスプラチンが175mMのチオ硫酸ナトリウムの添加により中和処理されたことを意味する。

【0053】

[シスプラチンの赤血球製剤への溶血毒性]

図1に示す血液バッグシステムの400mLのCPDA血液バッグに、ヒト健康人より採血を行い、RC-MAPを調製した。その後、RC-MAP 1mLを無菌的に15mLの遠心管に採取し、1.67mMシスプラチン1mLと生理食塩液1mLとを軽く混和して添加し、室温(暗所)で7時間反応させた。その後、生成液を2000rpmで5分間遠心分離し、遠心上清にDrabkin's 試薬を加えて反応させ、540nmの吸光度を測定して、溶血率をシアンメトヘモグロビン法により測定した。その結果、シスプラチンの溶血率は0.1%以下であり、赤血球製剤に対して溶血毒性が低かった。

【0054】

[発明の効果]

本発明で使用する抗がん剤の白金化合物は、体外の血液バッグで使用し、病原微生物を不活化した後に、抗がん剤の中和処理または洗浄処理を行い、本来の抗がん剤としての使用量よりも遥かに高濃度で体内に戻すため、がん治療に使用する抗がん剤の本来の用法とは全く異なり、微生物学的および毒性学的に安全な血液製剤を供給することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の血液バッグシステムの概念図。

【図 2】 白金化合物の S V - 4 0 死滅効果を示すグラフ。

【図 3】 シスプラチンのエルシニア菌不活化効果を示すグラフ。

【図 4】 シスプラチンのメチオニンを用いた中和処理効果を示すグラフ。

【図 5】 シスプラチンのチオ硫酸ナトリウムを用いた中和処理効果を示すグラフ。

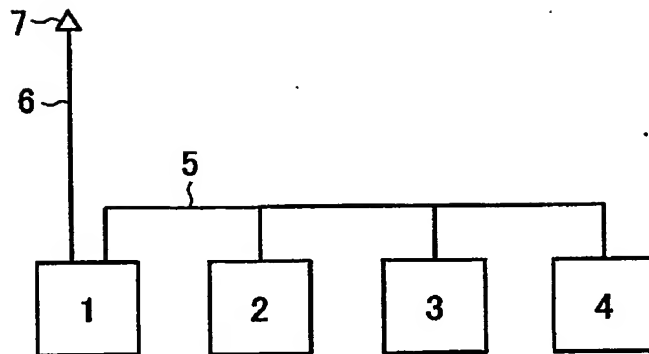
【符号の説明】

- 1 血液バッグ
- 2 容器
- 3, 4 血液成分バッグ
- 5 連結チューブ
- 6 採血チューブ
- 7 採血針

【書類名】

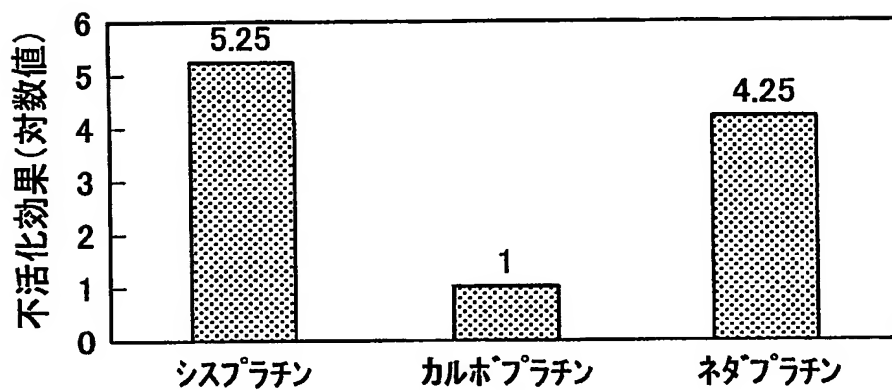
図面

【図 1】

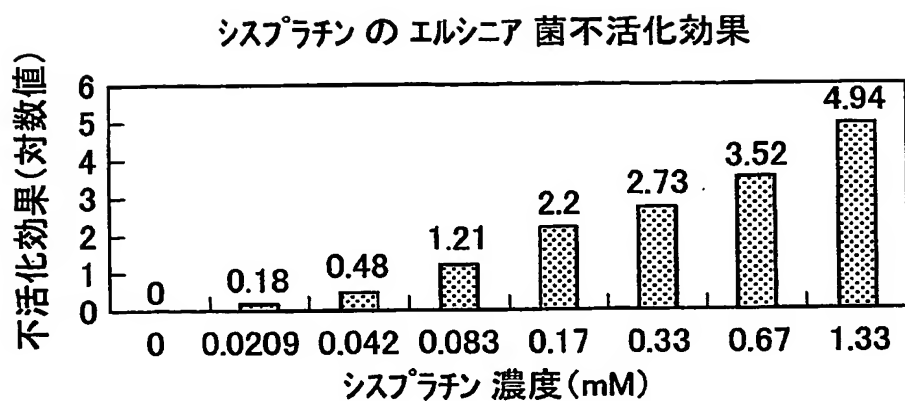


【図 2】

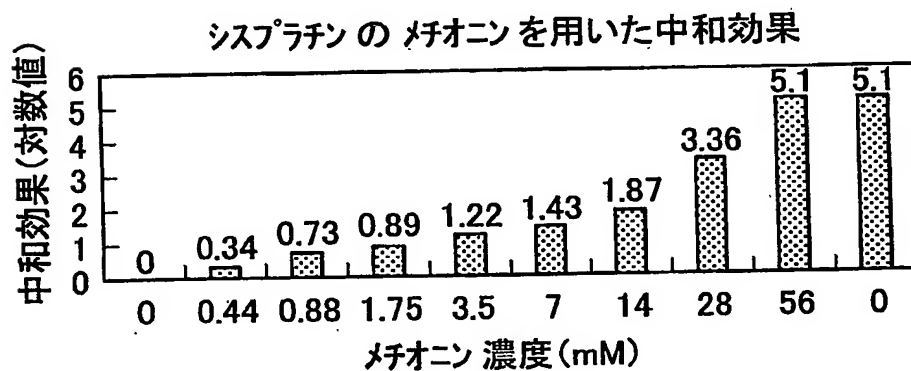
白金化合物の SV-40 死滅効果



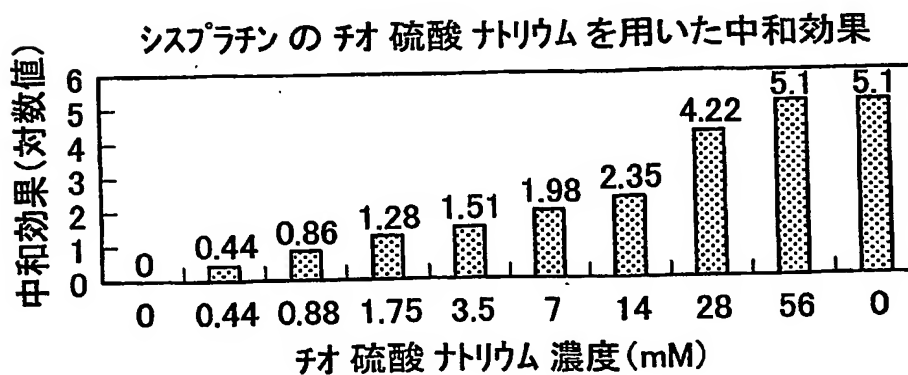
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血液中の微生物の不活化効果が大きく、持続性があり、かつ光、温度などの環境条件に対して安定な血液製剤用血液バッグシステム、血液中の病原微生物の不活化方法、および該不活化剤を中和処理する方法の提供。

【解決手段】 抗凝固剤が収容された血液バッグと、血液に含まれる微生物を不活化する不活化剤が収容された容器とが連結された血液バッグシステムであって、該不活化剤が、該微生物の核酸に結合できる白金化合物または該白金化合物のアコ錯体を主成分とするものであることを特徴とする血液バッグシステム、および該システムを用いる微生物の不活化方法、さらに、チオ硫酸ナトリウムなどの中和剤を添加して不活化剤を中和処理する方法。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000109543]

1. 変更年月日 1990年 8月11日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
氏 名 テルモ株式会社